

# BÖLN

Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
und andere Formen nachhaltiger  
Landwirtschaft

## Erhöhung der Fettsäuresynthese von Regenbogenforellen durch Isoflavone

Enhancement of fatty acid synthesis by isoflavones in rainbow trout

**FKZ: 15NA044**

**Projektnehmer:**

Universität Kiel, Institut für Tierzucht und Tierhaltung, Abt. Marine Aquakultur

Hermann-Rodewald-Straße 6, 24098 Kiel

Tel.: +49 431 880-2584

Fax: +49 431 880-2588

E-Mail: [cschulz@tierzucht.uni-kiel.de](mailto:cschulz@tierzucht.uni-kiel.de)

Internet: <https://www.tierzucht.uni-kiel.de/de/institut>

**Autoren:**

Fickler, Anna

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.

# ENDBERICHT

Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2016 – 30.04.2019

## Erhöhung der Fettsäuresynthese von Regenbogenforellen durch Isoflavone - ISOFETT -

### **Antragsteller:**

CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL (CAU), Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, Institut für Tierzucht und Tierhaltung, Abt. Marine Aquakultur, Hermann-Rodewald-Straße 6, 24098 Kiel  
Prof. Dr. Carsten Schulz, cschulz@tierzucht.uni-kiel.de, Tel.: 04834-604216 oder 0431-8802588

### **Kooperationspartner:**

CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL (CAU), Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Abt. Lebensmittelwissenschaft, Hermann-Rodewald-Straße 6, 24098 Kiel  
Prof. Dr. Gerald Rimbach, rimbach@foodsci.uni-kiel.de, Tel.: 0431-8802583

Gefördert durch das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluss angewandter und ggf. neuartiger technologischer und biotechnologischer Verfahren, marktstruktureller und rechtlicher Rahmenbedingungen auf die Produktionskette und die Qualität von Lebensmitteln und Futtermitteln

**Projektnummer 2815NA044**

## Zusammenfassung

Anna Fickler

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Tierzucht und Tierhaltung, Hermann-Rodewald-Str. 6, 24098 Kiel

fickler@gma-buesum.de

Der Einsatz von Fischöl als Futtermittelrohstoff ist durch die begrenzte Produktionsmenge bei gestiegener Nachfrage und einer damit einhergehenden Preiserhöhung zu einem limitierenden Faktor in der Aquakulturproduktion geworden. Auf Grund dessen werden vermehrt pflanzliche Öle als Substitut für Fischöl in der Fischernährung eingesetzt, was zu einer Senkung der Produktqualität der Fische durch niedrigere Gehalte an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (LC-PUFA, englisch: long-chain polyunsaturated fatty acids) führt. Ziel dieses Projekts war es deshalb, Möglichkeiten zur Steigerung der endogenen Biosynthese von LC-PUFA zu evaluieren, um die Gehalte an Eicosapentaensäure (20:5n-3, EPA) und Docosahexaensäure (22:6n-3, DHA) in der Regenbogenforelle zu erhöhen.

Isoflavone sind bioaktive Substanzen, die über verschiedene Wirkmechanismen die Fettsäurebiosynthese beeinflussen können. Sie können als Liganden für Transkriptionsfaktoren fungieren, die zentral an der LC-PUFA Biosynthese beteiligt sind. Außerdem besitzen sie als Phytoöstrogene eine Strukturähnlichkeit zum Östrogen Estradiol. Da die Expression bestimmter Gene der LC-PUFA Synthese durch Östrogen beeinflusst werden kann, könnte dadurch ebenfalls der Gehalt an EPA und DHA im Fisch gesteigert werden.

Deshalb sollten im Zellkulturmodell wirksame Isoflavon-Varianten identifiziert werden, die zu einer Erhöhung der EPA- und DHA-Spiegel beitragen könnten. Beispielsweise akkumulierte die  $\alpha$ -Linolensäure (18:3n-3, ALA) im humanen *in-vitro*-Modell durch die Gabe von Genistein, jedoch sank der EPA-Gehalt signifikant ab und der DHA-Gehalt wurde nicht reguliert. Im Regenbogenforellen-Hepatozyten-Modell blieb die Fettsäuresynthese durch Genistein gänzlich unbeeinflusst.

Im ersten *in vivo* Versuch sollten nun ebenfalls diejenigen Isoflavone und diätetischen Fettsäuremuster identifiziert werden, die einen positiven Einfluss auf die LC-PUFA-Gehalte in der Regenbogenforelle haben. Als zusätzliche Komponente, die LC-PUFA Biosynthese zu steigern, wurde das Öl der Pflanze *Buglossoides arvensis* in die Studien mit aufgenommen. Dieses Öl ist sowohl reich an ALA, als auch an Stearidonsäure (18:4n-3, SDA). SDA ist in den kommerziell verwendeten Pflanzenölen für die Fischernährung nicht vorhanden. Durch die direkte Bereitstellung von SDA über das Futtermittel sollte die Effizienz der Synthese gesteigert werden. Für den Versuch wurden nun verschiedene Isoflavone (Daidzein, Biochanin A, Formononetin, Equol and Genistein) mit drei verschiedenen Ölkombinationen kombiniert: Eine Mischung, basierend auf Fischöl und pflanzlichen Ölen, eine Mischung aus herkömmlichen pflanzlichen Ölen und eine Mischung aus herkömmlichen pflanzlichen Ölen und dem Öl der Pflanze *Buglossoides arvensis*. Zusätzlich gab es jeweils eine Diät dieser Ölmischungen ohne Additiv, die als Kontrolldiät verwendet wurde. In diesem Versuch zeigten alle Fische, die mit einer Equol- bzw. Genistein-Diät gefüttert wurden, einen leicht erhöhten DHA-Gehalt im Ganzkörperhomogenat im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Der Effekt der Substanzen auf die endogene Biosynthese konnte allerdings nicht durch molekularbiologische Methoden nachgewiesen werden, da die hepatischen mRNA Level der delta-6-Desaturase (*fads2a(d6)*) und der Carnitin Palmitoyltransferasen 1 a und c keine Veränderung im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe aufwiesen, beziehungsweise

sogar gegensätzlich beeinflusst wurden (*fads2a(d6)*). Insgesamt konnten die Fische, denen Diäten mit rein pflanzlichen Ölen verabreicht wurden, nicht die LC-PUFA Gehalte der Fische erreichen, die mit einer Fischöl-basierten Diät gefüttert wurden. Beim Vergleich der Kontrollgruppen zeigte sich, dass die Fische, die mit *Buglossoides arvensis* Öl gefüttert wurden, höhere EPA-Gehalte im Ganzkörperhomogenat aufwiesen, als diejenigen Fische, die mit den kommerziellen pflanzlichen Ölen gefüttert wurden.

Der zweite Versuch wurde in zwei Teilversuche untergliedert. Im ersten Teil sollte eine weitere Steigerung der DHA-Gehalte in den Forellen erzielt werden, indem ihnen Diäten mit Equol und Genistein zu unterschiedlichen Konzentrationen verabreicht wurden. Die Substanzen wurden mit zwei verschiedenen Ölkombinationen kombiniert: Einerseits wurde eine Mischung aus herkömmlichen pflanzlichen Ölen verwendet, andererseits eine Mischung aus herkömmlichen pflanzlichen Ölen und dem Öl der Pflanze *Buglossoides arvensis*. In den Fischen, die eine Kombination aus rein pflanzlichen Ölen und Genistein bzw. Equol erhalten haben, wurden keine Effekte auf die Fettsäuremuster der Fischgewebe nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wiesen diejenigen Fische, die eine Kombination aus *Buglossoides arvensis* und Equol erhielten, im Vergleich zur Kontrollgruppe marginal erhöhte LC-PUFA-Gehalte in den Geweben auf. Dagegen gab es keine Erhöhung der LC-PUFA Gehalte in den Fischen, die mit den Genistein-Diäten gefüttert wurden.

Im zweiten Teil des zweiten Versuchs sollte das Öl der Pflanze *Buglossoides arvensis* auf seine Eignung als Futtermittelrohstoff hin untersucht werden. Durch das besondere Fettsäuremuster dieses Öls sollte die Effizienz der LC-PUFA-Biosynthese gesteigert werden. Hierfür wurde eine Diät basierend auf einer Mischung aus Fischöl und pflanzlichen Ölen schrittweise mit diesem Öl substituiert. Die höchsten Gehalte dieses Öls führten zu einem Anstieg des EPA-Gehalts im Filet der Forellen, verglichen mit der Kontrollgruppe. Der DHA-Gehalt im Filet war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Fütterungsgruppen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die endogene Biosynthese von LC-PUFA in Regenbogenforellen sowohl durch ein bestimmtes Fettsäuremuster der Nahrung als auch durch bioaktive Substanzen, respektive deren Kombination gesteigert werden kann. Die Wirkung der Substanzen Equol und Genistein scheint allerdings abhängig von der verabreichten Dosis und des Fettsäuremusters des Futtermittels zu sein. Diesbezüglich ist noch Forschungsbedarf nötig. Dagegen ist die Wirkung des Öls der Pflanze *Buglossoides arvensis* auf die EPA Gehalte im Filet vorhanden und eine Steigerung von DHA scheint durch einen längeren Versuchszeitraum plausibel. Deshalb hat das *Buglossoides arvensis* Öl bzw. ein SDA-reiches Äquivalent ein höheres Potential zur Steigerung der LC-PUFA Biosynthese in Regenbogenforellen verglichen mit den hier untersuchten bioaktiven Substanzen.

## Summary

Anna Fickler

Kiel University, Institute of Animal Breeding and Husbandry, Hermann-Rodewald-Str. 6, 24098 Kiel

fickler@gma-buesum.de

The use of fish oil as a feed ingredient has become a limiting factor in aquaculture production. The limited availability concomitant with the high demand excessively increased its price. As a result, vegetable oils are increasingly used as a substitute for fish oil in fish nutrition, which leads to a reduction in the product quality of fish due to lower contents of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA). The aim of this project was, therefore, to evaluate different approaches to enhance the endogenous biosynthesis of LC-PUFA in order to increase the levels of eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA) in rainbow trout.

Isoflavones are bioactive substances that can influence the fatty acid biosynthesis via various mechanisms of action. They are potent ligands for transcription factors centrally involved in the LC-PUFA biosynthesis. In addition, they belong to the group of phytoestrogens and thus, have a structural similarity to the estrogen estradiol. Since the expression of certain genes involved in the LC-PUFA synthesis can be influenced by estrogen, isoflavones could increase the content of EPA and DHA in fish.

An *in vitro* cell culture study was conducted to identify isoflavones that increase EPA and DHA levels. For example,  $\alpha$ -linolenic acid (18: 3n-3, ALA) accumulated in the human *in vitro* model by the administration of genistein. However, the EPA content decreased significantly and the DHA content was not altered. In rainbow trout hepatocytes, the synthesis of fatty acids was not affected by genistein.

In the first *in vivo* experiment, it should be investigated which isoflavones are able to positively affect the LC-PUFA levels in rainbow trout. As an additional approach to increase the LC-PUFA biosynthesis, the oil of the plant *Buglossoides arvensis* was included into the study. This oil is rich in both ALA and stearidonic acid (18:4n-3, SDA). SDA is not present in vegetable oils commercially used for fish nutrition. Using dietary SDA might increase the efficiency of the endogenous biosynthesis. For the experiment, different isoflavones (daidzein, biochanin A, formononetin, equol and genistein) were combined with three different oil compositions: an oil blend based on fish oil and vegetable oils, a blend of commercial vegetable oils and a blend of vegetable oils and *Buglossoides arvensis* oil. One diet each without supplementation served as a control diet. Equol and genistein fed fish showed slightly increased DHA levels in whole body homogenates compared to those fed the control diets without supplementation. The effect of the substances on the endogenous biosynthesis, however, could not be confirmed by molecular biological methods. The hepatic mRNA steady state levels of the delta-6-desaturase (*fads2a(d6)*) and the carnitine palmitoyltransferases 1 a and c were not altered in comparison to the values of the control group, or showed contradictory effects (*fads2a(d6)*). Overall, fish fed the diets containing vegetable oils could not reach the LC-PUFA levels of fish fed with a fish oil-based diet. When comparing the control groups, it was found that fish fed with *Buglossoides arvensis* oil had higher total body homogenate EPA levels than those fed the diet based on commercial vegetable oils.

The second experiment was divided into two sub-experiments. In the first part, different dietary doses of equol and genistein were used to further increase the DHA levels in rainbow trout. The substances were combined with two different oil compositions: a blend of commercially available vegetable oils and a blend of these vegetable oils and the *Buglossoides arvensis* oil. Fish fed the diets with vegetable oils and genistein and equol, respectively, did not show any effects on the levels of EPA and DHA in their tissues. In contrast, fish that received the *Buglossoides arvensis* oil blend combined with equol had marginally increased LC-PUFA tissue levels compared to fish fed the control diet without supplementation. In contrast, there was no increase in LC-PUFA levels in fish fed with the genistein diets.

In the second part of the second experiment, the potential of the *Buglossoides arvensis* oil was examined for its suitability as an ingredient in rainbow trout feed. The special fatty acid composition of this oil was supposed to increase the efficiency of the LC-PUFA biosynthesis. For this purpose, a diet based on a blend of fish oil and vegetable oils was gradually substituted with the *Buglossoides arvensis* oil. The highest levels of this oil resulted in an increase in fillet EPA levels in rainbow trout compared to fish fed the control diet. DHA fillet levels did not differ significantly among treatments.

In summary, this work shows that the endogenous biosynthesis of LC-PUFA in rainbow trout can be increased by a specific dietary fatty acid composition as well as by bioactive substances or the combination of both. However, the effect of the substances equol and genistein seems to be dependent on the dose administered and the fatty acid composition of the feed. In this regard, there is still a need for research. In contrast, *Buglossoides arvensis* oil has a positive effect on the EPA levels in the fillet and an increase of DHA seems plausible by extending the experimental period. Therefore, the *Buglossoides arvensis* oil or an SDA-rich equivalent has a higher potential to increase the LC-PUFA biosynthesis in rainbow trout in comparison to the bioactive substances.

# Inhalt

1. Einführung.....	6
1.1 Gegenstand des Vorhabens .....	6
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts .....	6
1.3 Planung und Ablauf des Projektes .....	7
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	7
3. Material und Methoden .....	9
3.1 <i>In vitro</i> Versuche zu Fragestellungen 1. und 2. ....	9
3.2 <i>In vivo</i> Versuch 1 zu Fragestellung 3. ....	9
3.3 <i>In vivo</i> Versuch 2 zu den Fragestellungen 4-6. ....	10
4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	12
4.1 Ergebnisse aus den <i>in vitro</i> Untersuchungen .....	12
4.2 Ergebnisse aus Versuch 1 .....	12
4.3 Ergebnisse aus Versuch 2a .....	14
4.4 Ergebnisse aus Versuch 2b .....	14
5. Diskussion der Ergebnisse .....	16
6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	18
7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen .....	19
8. Zusammenfassung .....	19
9. Literaturverzeichnis .....	20
10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse.....	24
10.1 Dissertation.....	24
10.2 Veröffentlichungen: .....	24
10.3 Vorträge .....	24
10.4 Studienarbeiten.....	25

# 1. Einführung

## 1.1 Gegenstand des Vorhabens

Omega-3 (n-3) Fettsäuren sind von großer Bedeutung für die menschliche Gesundheit. Insbesondere die Fettsäuren Eicosapentaen- (EPA, 20:5n-3) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6n-3) sind für ihre potentiell gesundheitsfördernden Effekte bekannt. Während EPA entzündungshemmend wirken kann, ist DHA unter anderem für die neuronale Entwicklung von entscheidender Bedeutung [1,2]. Der menschliche Organismus ist in der Lage, EPA und DHA aus der essentiellen Vorläufer-Fettsäure  $\alpha$ -Linolensäure (ALA, 18:3n-3) endogen zu synthetisieren. Diese Biosynthese findet jedoch nur in begrenztem Maße statt (zusammengefasst in [3]). Deshalb wird empfohlen, pro Tag 650mg der hochungesättigten und langkettigen Fettsäuren (LC-PUFA; engl. long-chain polyunsaturated fatty acids) EPA und DHA über die Nahrung aufzunehmen [4]. Dabei ist Fisch die bedeutsamste Quelle dieser Fettsäuren in der Humanernährung. Der LC-PUFA Gehalt in Fischen hängt unter anderem stark von der jeweiligen Fischart und der Zusammensetzung der Fettsäuren in der Nahrung ab [5–7]. Im Gegensatz zu den meisten Seewasserrischen können viele Süßwasserfische wie die Regenbogenforelle, EPA und DHA endogen synthetisieren [8]. Ähnlich wie beim Menschen ist die Effizienz dieser Synthese jedoch begrenzt [9–11]. Um eine hohe Produktqualität von Aquakulturerzeugnissen für den menschlichen Verzehr zu gewährleisten, müssen folglich erhebliche Mengen dieser Fettsäuren über das Fischfutter bereitgestellt werden. In der Vergangenheit wurde dies vor allem über den Einsatz von marinen Rohstoffen wie Fischmehl und Fischöl in der Fischernährung umgesetzt [12–14]. Durch das kontinuierliche Wachstum des Aquakultursektors und dem damit einhergehenden zunehmenden Bedarf an marinen Rohstoffen, stieg der Preis für diese Produkte deutlich an [12]. Deshalb wurden vermehrt pflanzliche Öle als Substitut für Fischöl in Futtermitteln für Salmoniden eingesetzt [14]. Pflanzenöle sind günstiger als Fischöl und besser verfügbar, beinhalten jedoch außer ALA keine längerkettigen n-3 Fettsäuren [15–17]. Wie bereits erwähnt hat die Fettsäurezusammensetzung des Futtermittels einen beträchtlichen Einfluss auf die Fettsäurezusammensetzung des Fischfilets. Durch die Verwendung von Pflanzenölen im Futtermittel wird somit die Fettsäurezusammensetzung des Filets nachteilig modifiziert [18,19]. Durch die geringeren EPA- und DHA-Gehalte sowohl im Futter als auch dann im Fisch wird letztlich die Produktqualität des Filets für den menschlichen Verzehr reduziert. Um die Bereitstellung an EPA und DHA über das Lebensmittel Fisch für die Humanernährung gewährleisten zu können, ist die Identifikation alternative Rohstoffe, die ein Äquivalent zu Fischöl darstellen, von immenser Bedeutung. Potentielle Futtermittelrohstoffe wie Öle von primärproduzierenden Mikroalgen und gentechnisch veränderte Pflanzenöle, die EPA und DHA in nennenswerten Mengen enthalten, sind allerdings entweder noch nicht kommerziell erhältlich oder in ihrer Verwendung umstritten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Möglichkeiten zur Steigerung der Synthese von LC-PUFA zu evaluieren, um die Gehalte an EPA und DHA in der Regenbogenforelle zu erhöhen.

## 1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Ziel dieses Projektes ist es, die endogene Synthese von LC-PUFA bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) zu steigern. Die LC-PUFA Synthese im Fisch, insbesondere die Gehalte an EPA und DHA, soll dabei durch Verabreichung von Isoflavonen gesteigert werden. Im Fokus stehen zum einen die Untersuchung der Änderung physiologischer Parameter im



Fisch als auch die Aufklärung molekularer Mechanismen, die zu einer LC-PUFA Synthesesteigerung durch Applikation verschiedener Isoflavone und -konzentrationen führen.

### 1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Entgegen der ursprünglichen Projektbearbeitungszeit vom 01.01.2016 – 31.12.2018 wurden die Arbeiten im Vorhaben, auf Grundlage einer kostenneutralen Verlängerung, bis zum 30.04.2019 fortgesetzt. In diesem Projekt wurden Anna Fickler, Anke Schlösser und Svenja Wüpper als Mitarbeiterinnen angestellt.

Im vorliegenden Projekt soll deshalb den folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

1. Welche Isoflavone vermögen im Zellkulturmodell die LC-PUFA Synthese positiv zu beeinflussen?
2. Welche molekulare Mechanismen regulieren die Isoflavon-beeinflusste LC-PUFA Synthese in Fischen?
3. Können Isoflavone auch im *in vivo* Modell die LC-PUFA Synthese in Regenbogenforellen hochregulieren?
4. Welche Verabreichung ist notwendig, um die LC-PUFA Synthese im *in vivo* Modell zu beeinflussen?

Der Einsatz von *Buglossoides arvensis* Öl war in der Zielsetzung nicht vorgegeben. Die Studie wurde um den Aspekt des Einsatzes eines pflanzlichen Öles zur Verbesserung des Fettsäuremusters bei der Regenbogenforelle erweitert und folgende Fragestellungen wurden hinzugefügt:

5. Kann eine Kombination aus *Buglossoides arvensis* Öl und Isoflavonen die LC-PUFA Synthese *in vivo* in der Regenbogenforelle hochregulieren?
6. Ist *Buglossoides arvensis* Öl eine potentielle Alternative zu Fischöl in Futtermitteln für Regenbogenforellen?

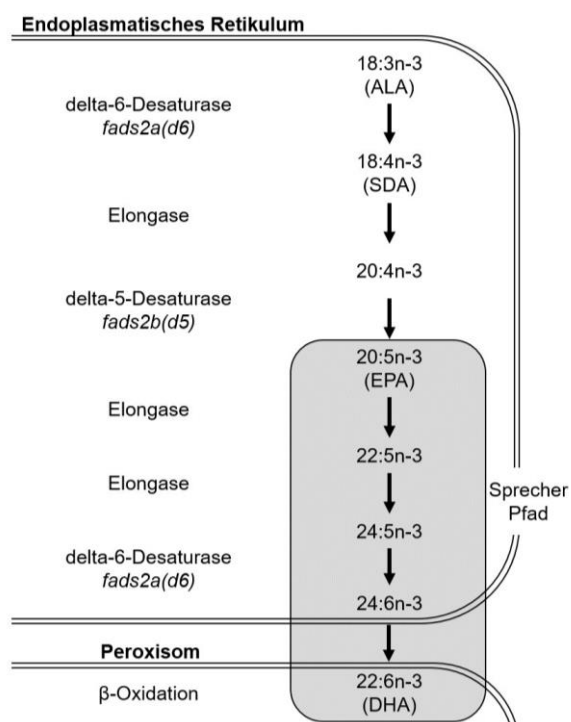
Die molekularbiologischen Analysen wurden vom Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde in Kiel durchgeführt. Die *in vivo* Versuche mit Regenbogenforellen fanden an der Gesellschaft für Marine Aquakultur mbH (GMA) in Büsum statt. Dort wurde auch die Nährstoffzusammensetzung der Futtermittel und der Gewebeproben der Fische analysiert. Die Fettsäureanalytik der aus den *in vivo* Versuchen gewonnenen Gewebeproben und der Futtermittel wurde, wie geplant, von der LUFA-ITL in Kiel ausgeführt.

## 2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die endogene Biosynthese von n-3 LC-PUFA ist komplex und beinhaltet verschiedene Desaturierungs- und Elongations-Schritte und eine peroxisomale  $\beta$ -Oxidation (Abbildung 1). Diese Synthese kann durch verschiedene Faktoren wie beispielsweise Nahrungsfettsäuren und Hormone reguliert werden [20–23]. Die Verwendung von bioaktiven Substanzen, wie Isoflavone und der Isoflavon-Metabolit Equol, scheint ein geeignetes Mittel zur Stimulierung der endogenen LC-PUFA Biosynthese in der Regenbogenforelle zu sein. Isoflavone wie beispielsweise Genistein und Daidzein kommen natürlicherweise in Pflanzen wie Soja (*Glycine max*) vor [24]. Formononetin und Biochanin A sind in Rotklee (*Trifolium pratense*) vorhanden

[25]. Equol ist ein Metabolit des Isoflavones Daidzein und kann durch Darmbakterien in Tieren und im Menschen gebildet werden [26,27]. Diese Substanzen besitzen Eigenschaften, die die Biosynthese über verschiedene Mechanismen beeinflussen können. Zum Beispiel haben sie eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Hormon Östrogen, weshalb sie zu der Gruppe der Phytoöstrogene gezählt werden [28]. Durch diese Strukturähnlichkeit sind sie in der Lage an Östrogen-Rezeptoren zu binden und Östrogen nachzuahmen [29–32]. Dies könnte von besonderer Bedeutung sein, weil Gene, die für Proteine kodieren, die an der LC-PUFA Synthese beteiligt sind, nachweislich durch Östrogen beeinflusst werden können [20,33,34]. Zum Beispiel wurde die hepatische delta-6-Desaturase Expression durch die Gabe von Estradiol in Ratten hochreguliert [33,35]. Die delta-6-Desaturase ist unter anderem nötig, um EPA weiter zu DHA zu synthetisieren [36]. Die Autoren dieser Studie vermuten, dass die Erhöhung der DHA-Gehalte in den Ratten durch die Steigerung der delta-6-Desaturase Expression zu erklären ist [33]. Über eben diesen Mechanismus könnte folglich die LC-PUFA Synthese in der Forelle gesteigert werden.

Außerdem sind Phytoöstrogene potentielle Liganden für Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel der Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha (PPAR $\alpha$ ) [37]. PPAR $\alpha$  ist zentral an der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation beteiligt, die nötig ist, um DHA zu synthetisieren [38]. Bislang ist allerdings wenig über das Potential und die Wirkweise dieser Substanzen auf den Lipidmetabolismus in Fischen bekannt. Auch über die notwendigen Konzentrationen an Isoflavonen, die mindestens erforderlich sind, um eine Induktion der LC-PUFA Synthese zu erzielen, gibt es bislang keine Daten. Studien mit bioaktiven Substanzen deuten darauf hin, dass diese Stoffe im Organismus dosisabhängige Wirkungen entfalten können [39–41]. Daher könnten unterschiedliche diätetische Konzentrationen zu einer verstärkten Stimulation der LC-PUFA-Biosynthese in Regenbogenforellen führen. Weiterhin sind die involvierten molekularen Regulationsmechanismen, die diese Induktion bewirken, nur unzureichend beschrieben.



**Abbildung 1 Schematische Darstellung der endogenen Biosynthese der omega-3 Fettsäuren.** Der erste Teil beschreibt die Synthese von EPA aus ALA über SDA. Der zweite Teil, auch bekannt als der Sprecher Pfad, ist die Konversion von EPA zu DHA. Bis auf die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation finden alle Schritte im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle statt. Abbildung nach Tocher et al. [42].

Es gibt jedoch auch andere Möglichkeiten, die Biosynthese in Regenbogenforellen zu steigern. Zum Beispiel können Fettsäuren, die über die Nahrung aufgenommen wurden, die Expression von Genen, die maßgeblich an der Biosynthese beteiligt sind, regulieren [43]. Über einen negativen Feedback-Mechanismus kann die Abwesenheit von LC-PUFA die Genexpression eben dieser Gene erhöhen und somit die Synthese von EPA und DHA steigern. Darüber hinaus könnte eine Steigerung der Substratmenge der Fettsäuren ALA bzw. der Stearidonsäure (18:4n-3, SDA) die Gesamteffizienz der Biosynthese weiter erhöhen. [18]. Dies wäre beispielsweise durch die Verwendung eines Stearidonsäure- (18:4n-3, SDA) reichen Öls im Futtermittel der Fische möglich. Im Gegensatz zu herkömmlichen Pflanzen enthalten Pflanzen wie *Buglossoides arvensis*, *Echium plantagineum* und *Ribes nigrum* natürlicherweise SDA. Die Gehalte an SDA in diesen Ölen variieren zwischen 3% (*Ribes nigrum*) [44] und ~13% (*Echium plantagineum*) bis hin zu 18% (*Buglossoides arvensis*). Es wird vermutet, dass der delta-6-Desaturase-Schritt von ALA zu SDA der limitierende Syntheseschritt der LC-PUFA Biosynthese in Vertebraten ist [45]. Indem man nun diesen ersten Syntheseschritt umgeht und direkt SDA über das Futter bereitstellt, könnte die Gesamteffizienz der LC-PUFA Biosynthese gesteigert werden. Dies wurde bereits in Studien mit Menschen [46,47] und verschiedenen Tieren [48,49] nachgewiesen und führte zu erhöhten EPA Gehalten. Das Öl der Pflanze *Buglossoides arvensis* ist außerdem reich an ALA [50]. Durch den Einsatz dieses Öls im Futtermittel könnte die endogene Biosynthese der Regenbogenforellen sowohl über die erhöhte Substratmenge an ALA als auch durch die gesteigerte Effizienz mittels SDA erhöht werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 *In vitro* Versuche zu Fragestellungen 1. und 2.

Für die Zellkulturstudien wurde zunächst die humane Hepatozyten-Zelllinie HepG2 eingesetzt.

Initial wurden die maximalen, nicht-zytotoxischen Konzentrationen der zu testenden Isoflavone mittels Neutralrot-Assay ermittelt. Zur Determinierung der transkriptionssteigernden Wirkung der Isoflavone auf die delta-6-Desaturase (FADS2) und  $\Delta$ 5-Desaturase (FADS1) wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: Genistein (50  $\mu$ mol/L), Daidzein (50  $\mu$ mol/L), Formononetin (50  $\mu$ mol/L), Biochanin A (50  $\mu$ mol/L), Prunetin (10  $\mu$ mol/L), Pratensein (10  $\mu$ mol/L) und Orobol (10  $\mu$ mol/L). Zunächst wurde die mRNA-expressionssteigernde Wirkung auf die FADS2 und FADS1 in Abwesenheit des LC-PUFA-Precursors  $\alpha$ -Linolensäure (ALA) bestimmt, da unter ALA-Anwesenheit erwartungsgemäß die Desaturasen-Expression vermindert wird.

Die drei vielversprechendsten Isoflavone Genistein, Daidzein und Formononetin in Regenbogenforellen-Hepatozyten (D-11) wurden auf ihre maximale, nicht zytotoxische Konzentration hin gescreent und auf ihre FADS2-expressionssteigernde Wirkung hin untersucht. Weiterhin wurden sowohl in HepG2- als auch D-11-Zellen die Fettsäuremuster nach Inkubation mit den genannten Isoflavonen determiniert.

#### 3.2 *In vivo* Versuch 1 zu Fragestellung 3.

**Fragestellung 3:** Können Isoflavone auch im *in vivo* Modell die LC-PUFA Synthese in Regenbogenforellen hochregulieren?

In **Versuch 1** wurden vier verschiedene Isoflavone und der Isoflavon-Metabolit Equol hinsichtlich ihres Potentials, die LC-PUFA-Biosynthese in Regenbogenforellen zu stimulieren, untersucht. Dafür wurde eine Basalmischung – alle Mehlkomponenten dieser Mischung waren für alle Diäten identisch – konzipiert. Diese Basalmischung wurde mit drei verschiedenen Ölzusammensetzungen ergänzt: Eine Mischung aus Fischöl und pflanzlichen Ölen (FVO), eine Mischung aus rein pflanzlichen Ölen (VO) und eine Mischung aus Ahiflower Öl und pflanzlichen Ölen (AVO). Diese Diäten wurden wiederum unterteilt in je eine Kontrolldiät ohne Zusatzstoff (C) und je fünf Diäten supplementiert mit Biochanin A (BA), Daidzein (DA), Formononetin (FO), Equol (EQ) und Genistein (G) zu 0,15% der Trockenmasse der Diät. Alle Diäten enthielten gleiche Gehalte an ALA+SDA und deckten den Bedarf der Regenbogenforelle an ALA [15]. Im Gegensatz zu den FVO-Diäten lagen alle VO- und AVO-Diäten unterhalb der empfohlenen Gehalte an EPA und DHA für Regenbogenforellen [15]. Diese 18 Diäten wurden mit 2% der Fischbiomasse/Tag über einen Zeitraum von acht Wochen an juvenile Regenbogenforellen (Initialgewicht 87g) verfüttert. Die Fische wurden in einer Kreislaufanlage bei konstanter Temperatur ( $16,0^{\circ}\text{C} \pm 0,6$ ) gehalten. Zum Versuchsstart und Versuchsende wurden folgende Parameter gemessen bzw. Proben genommen: Beckengewicht, Fischgewicht und –länge, Ganzkörperhomogenat, Filet, Lebergewicht, Milzgewicht und Leber- und Filetproben für Messung der mRNA steady state und Protein-Level.

C-FVO	C-VO	C-AVO
FVO-BA	VO-BA	AVO-BA
FVO-DA	VO-DA	AVO-DA
FVO-FO	VO-FO	AVO-FO
FVO-EQ	VO-EQ	AVO-EQ
FVO-G	VO-G	AVO-G

**Abbildung 2 Versuchsaufbau Versuch 1.** Untersuchung des Potentials der Isoflavone Biochanin A (BA), Daidzein (DA), Formononetin (FO), Equol (EQ) und Genistein (G) zur Steigerung der Fettsäurebiosynthese von EPA und DHA in Verbindung mit verschiedenen Ölkombinationen: Fischöl und pflanzliche Öle (FVO), pflanzliche Öle (VO) und *Buglossoides arvensis* Öl und pflanzliche Öle (AVO). Zusätzlich jeweils eine Kontrolldiät ohne Zusatzstoff (C).

### 3.3 In vivo Versuch 2 zu den Fragestellungen 4-6.

Der zweite Versuch wurde in zwei Teilversuche (2a und 2b) unterteilt (s. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). In diesem Experiment wurden juvenilen Regenbogenforellen (Initialgewicht 87g) verwendet und über eine Dauer von acht Wochen mit 1,6% der Biomasse der Fische pro Tag gefüttert. Die Fische wurden dabei in einer Kreislaufanlage bei konstanter Temperatur ( $14,8^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ ) gehalten. Zum Versuchsstart und Versuchsende wurden folgende Parameter gemessen bzw. Proben genommen: Beckengewicht, Fischgewicht und –länge, Ganzkörperhomogenat, Filet, Lebergewicht,

Milzgewicht und Leber- und Filetproben für Messung der mRNA steady state und Protein-Level.

#### Teilversuch 2a:

**Fragestellung 4:** Welche Verabreichung ist notwendig, um die LC-PUFA Synthese im *in vivo* Modell zu beeinflussen?

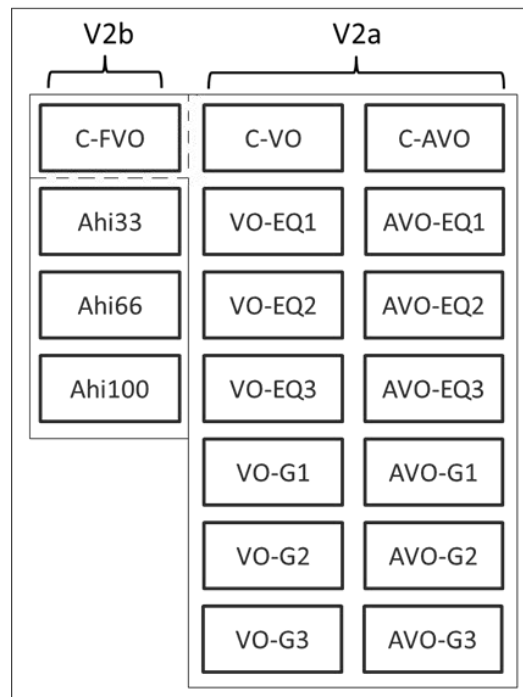
**Fragestellung 5:** Kann eine Kombination aus *Buglossoides arvensis* Öl und Isoflavonen die LC-PUFA Synthese *in vivo* in der Regenbogenforelle hochregulieren?

Im Teilversuch 2a wurde untersucht, ob es eine Dosis-Wirkungs-Beziehung von Equol und Genistein auf die LC-PUFA-Gehalte im Gewebe von Regenbogenforellen gibt. Als Basis-Kontrolle für die Versuche 2a und 2b wurde eine Diät basierend auf einer Mischung aus Fischöl und pflanzlichen Ölen (C-FVO), ohne weitere Zusatzstoffe, verwendet.

Für diesen Versuch (2a) wurden zwei unterschiedliche Ölmischungen konzipiert: Eine Mischung aus pflanzlichen Ölen (VO) und eine Mischung aus *Buglossoides arvensis* Öl und pflanzlichen Ölen (AVO). Diese beiden Futtermittel wurden nun mit Equol bzw. Genistein in einer Menge von 0, 0,1, 0,2 und 0,3% (C-, -EQ1, -EQ2, -EQ3, -G1, -G2, -G3) der Trockensubstanz der Diät ergänzt. Alle Diäten enthielten gleiche Gehalte an ALA+SDA und deckten den Bedarf der Regenbogenforelle an ALA [15]. Im Gegensatz zu der FVO-Diät lagen alle VO- und AVO-Diäten unterhalb der empfohlenen Gehalte an EPA und DHA für Regenbogenforellen [15].

#### Teilversuch 2b:

**Fragestellung 6:** Ist *Buglossoides arvensis* Öl eine potentielle Alternative zu Fischöl in Futtermitteln für Regenbogenforellen?



**Abbildung 3 Versuchsdesign des Fütterungsversuchs 2.** V2a untersucht die Dosis-Wirkungszusammenhänge der Isoflavone Equol (EQ) und Genistein (G) mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1, 0,2, 0,3% = 1, 2, 3) auf die Fettsäurebiosynthese in Abhängigkeit der Ölzusammensetzung des Futtermittels (VO: pflanzliche Öle, AVO: *Buglossoides arvensis* Öl und

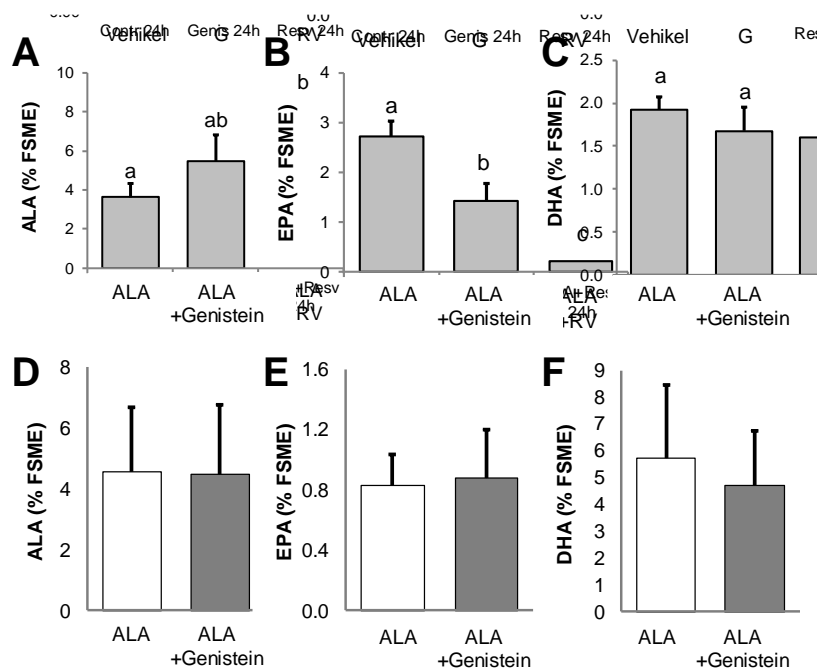
pflanzliche Öle). V2b stellt eine Produktevaluierung des *Buglossoides arvensis* Öls dar. Hier wurde die Fischöl-basierte-Kontrolldiät (FVO) durch 33, 66, und 100% des *Buglossoides arvensis* Öls ersetzt (Ahi33, Ahi66, Ahi100).

In Teilversuch 2b erhielten juvenile Regenbogenforellen vier Futtermittel. Als Kontrolle diente eine Diät, die auf einer Mischung aus Fischöl und pflanzlichen Ölen (FVO) basierte. Dieses Ölgemisch wurde zu 33, 66 und 100% durch *Buglossoides arvensis* Öl ersetzt (Ahi33, Ahi66, Ahi100). Mit zunehmendem Anteil des *Buglossoides arvensis* Öls stieg auch der Gehalt an ALA und SDA und gleichzeitig sank der Anteil an EPA und DHA in diesen Diäten.

## 4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse aus den *in vitro* Untersuchungen

Die Ergebnisse der Fettsäureanalysen spiegeln die mRNA-Expressionsmuster in Abhängigkeit der Isoflavon- und ALA-Inkubation wider. Zwar konnte im humanen *in-vitro*-Modell eine Akkumulation von ALA durch Genistein-Gabe erreicht werden (Abbildung 1A), gleichzeitig sank jedoch der EPA-Gehalt signifikant ab (Abbildung 1B), der DHA-Gehalt wurde nicht reguliert (Abbildung 1C). Im Regenbogenforellen-Hepatozyten-Modell blieb die Fettsäuresynthese durch Genistein gänzlich unbeeinflusst (Abbildung 1D-F).

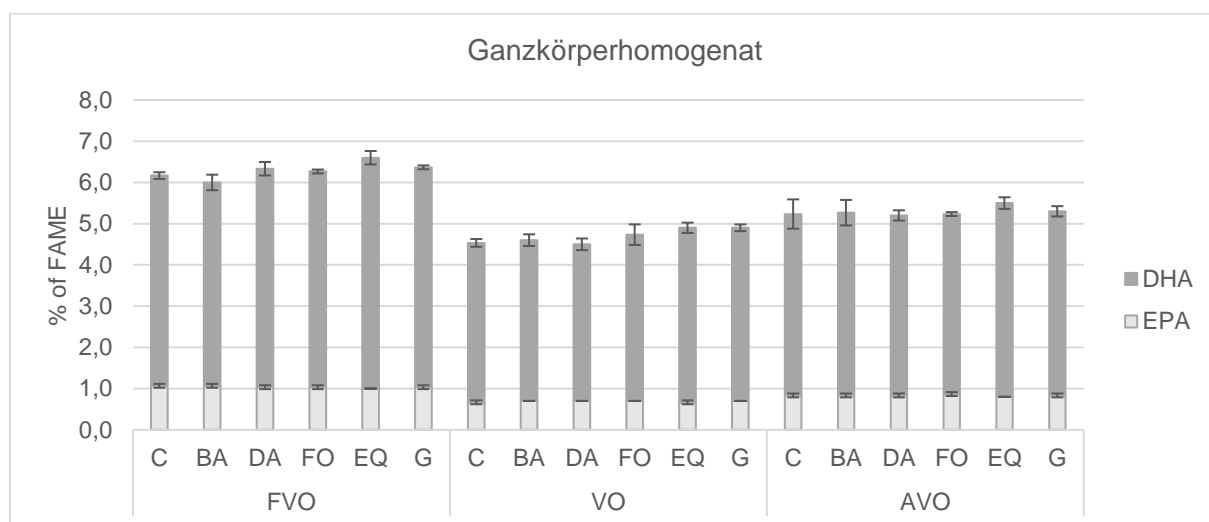


**Abbildung 4 Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen.** Fettsäuremuster von humanen Hepatozyten (HepG2; A-C) und Leberforelle-Hepatozyten (D-F) nach Inkubation mit  $\alpha$ -Linolensäure (ALA) und Genistein (HepG2: 50  $\mu$ mol/L; D-11: 100  $\mu$ mol/L) für 24h. Fettsäurespektren-Analyse nach Gesamtfettextraktion, Verseifung und Methylierung der freien Fettsäuren (Fettsäuremethylester: FSME) mittels GC-FID. <sup>a,b</sup> $p < 0,05$

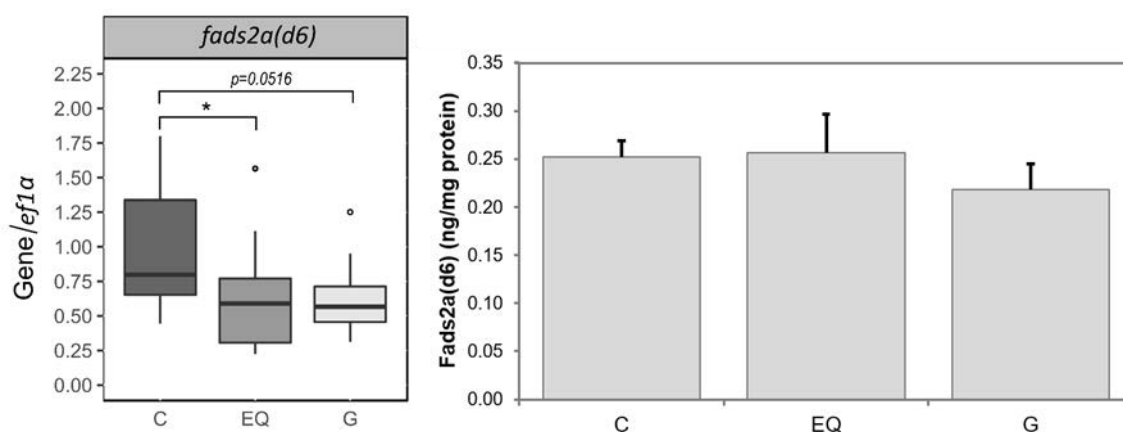
### 4.2 Ergebnisse aus Versuch 1

Die Fische aller Fütterungsgruppen verdreifachten ihr Startgewicht innerhalb der achtwöchigen Versuchsdauer ohne signifikante Unterschiede. Außerdem wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen in Bezug auf die Futterverwertung, die spezifische Wachstumsrate und weitere Performance-Parameter gefunden. Die Analyse der Nährstoffzusammensetzung von Ganzkörper- und Filetproben

unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant. Die Fettsäurezusammensetzung des Futtermittels hatte dagegen einen signifikanten Effekt auf den Gehalt an EPA und DHA in den Filet- und Ganzkörperhomogenatproben: FVO > AVO > VO, wobei Fische, die mit FVO-Diäten gefüttert wurden die höchsten Anteile an  $\Sigma$ EPA+DHA aufwiesen. Die Diäten mit Genistein- und Equol-Zulage wiesen teils leicht erhöhte, jedoch nicht signifikant unterschiedliche EPA- und DHA-Werte im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe auf. Die molekularbiologischen Untersuchungen zeigten eine Reduktion der mRNA steady state Level der delta-6 Desaturase in der Leber von Fischen, die mit Equol und pflanzlichen Ölen (VO-EQ) gefüttert wurden, jedoch keinen Effekt auf die Level der Carnitinpalmitoyltransferase 1 (cpt1) a und c. Dagegen wurden keine signifikanten Einflüsse der Futtermittel (C-VO, VO-EQ und VO-G) auf die Proteinmenge der delta-6 Desaturase gefunden.



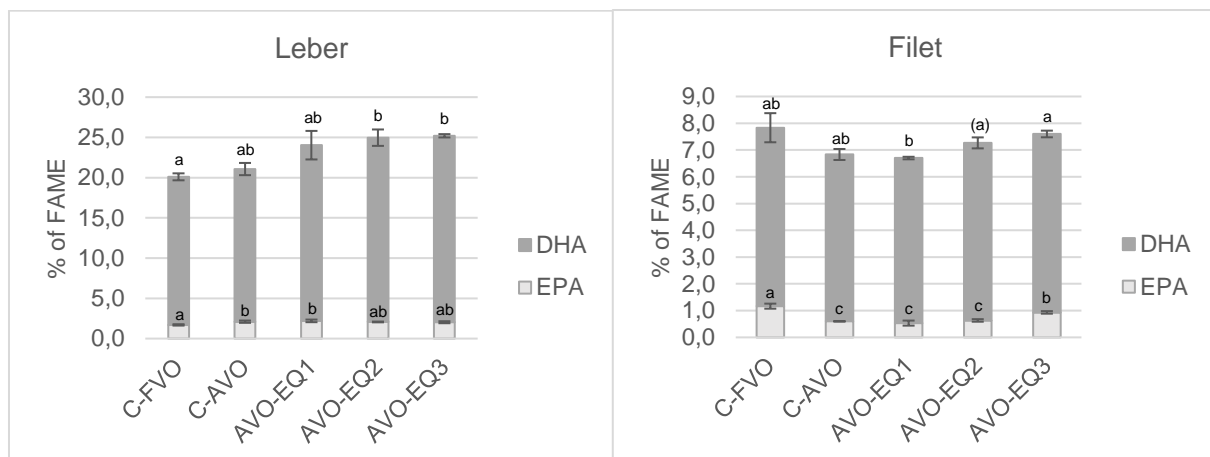
**Abbildung 5 EPA und DHA Gehalte im Ganzkörperhomogenat der Forellen aus Versuch 1.** Die Fische wurden mit den Diäten FVO (Fischöl und pflanzliche Öle), VO (pflanzliche Öle) und AVO (*Buglossoides arvensis* Öl und pflanzliche Öle) in Kombination mit den Isoflavonen Biochanin A (BA), Daidzein (DA), Formononetin (FO), Equol (EQ) und Genistein (G) für acht Wochen gefüttert. Daten (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3, bestehend aus je drei Fischen) ohne Beschriftung unterscheiden sich nicht signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 6 Hepatische mRNA steady state Level (links) und Proteingehalt (rechts) der delta-6 Desaturase aus Versuch 1.** Regenbogenforellen wurden acht Wochen lang mit den Diäten C-VO, VO-EQ und VO-G gefüttert. Hepatische mRNA steady state Level (n=15) wurde mittels qRT-PCR Analyse bestimmt und auf das Houskeeping Gen ef1a normalisiert. Proteingehalte der delta-6 Desaturase wurden mittels ELISA analysiert (n=4). Signifikante Unterschiede sind mit \* markiert;  $p < 0,05$  (\*).

### 4.3 Ergebnisse aus Versuch 2a

Alle Versuchsgruppen konnten ihr Initialgewicht über die acht Wochen hinweg mehr als verdoppeln. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf Wachstums- und Leistungsparameter gefunden. Die chemische Nährstoffzusammensetzung der Ganzkörperproben unterschied sich zwischen den Gruppen hinsichtlich des Gehalts an Rohprotein, Rohfett oder Rohasche nicht signifikant. Im Filet waren die Rohproteingehalte von AVO-EQ1 und -EQ2 im Vergleich zu FVO signifikant höher. Des Weiteren zeigten die Fische, die Diäten basierte auf pflanzlichen Ölen (VO-) in Kombination mit Genistein und Equol erhielten keine signifikanten Unterschiede bei den Gehalten an EPA und DHA im Filet, in der Leber und im Ganzkörperhomogenat. Bei den Fischen, die mit AVO-Diäten gefüttert wurden gab es dagegen Effekte auf die Gehalte dieser Fettsäuren. Der Gehalt an EPA zeigte kein konsistentes Muster zwischen den Gewebeproben, aber alle AVO-Gruppen waren durch höhere EPA-Werte der Leber als FVO gekennzeichnet. Die DHA-Werte von AVO-EQ2 und -EQ3 waren im Filet ähnlich zu denen der Fische, die mit FVO gefüttert wurden. Im Ganzkörperhomogenat waren die DHA-Gehalte tendenziell höher und in der Leber im Vergleich zu FVO signifikant erhöht im Vergleich zur FVO-Gruppe. Außerdem wiesen alle Fische, die mit EQ-Diäten gefüttert eine Vergrößerung der Leber und höhere Gehalte der Fettsäure 18:0 auf. Diese Effekte waren verstärkt mit zunehmender Equol-Menge in der Diät. Die Analyse der mRNA steady state Level der delta-6 Desaturase zeigte keine signifikanten Effekte des Equols.



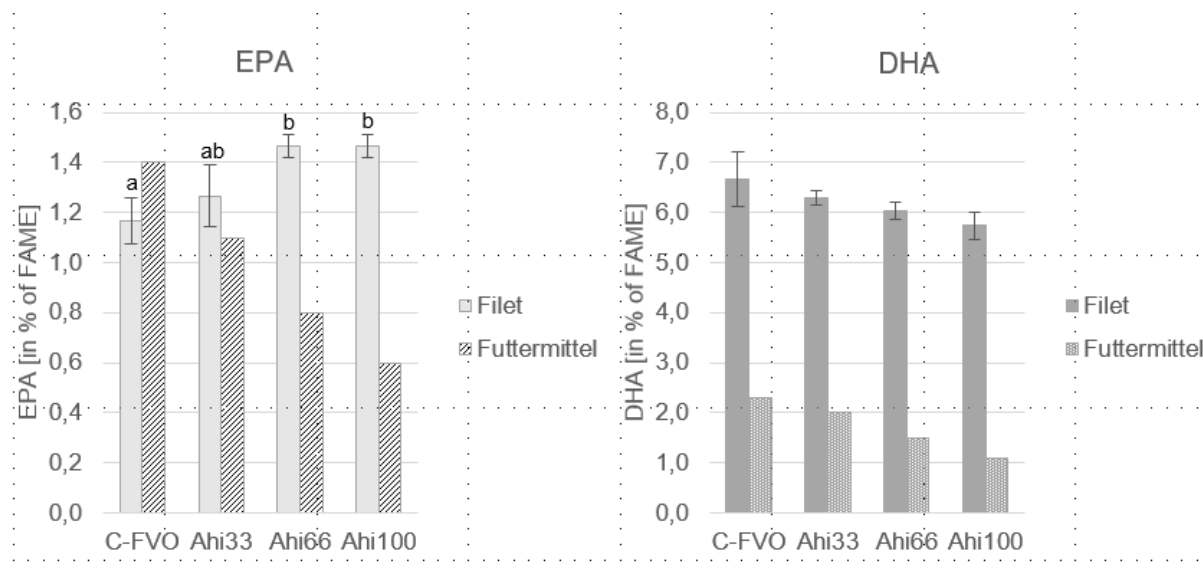
**Abbildung 7 EPA und DHA Gehalte in der Leber (links) und im Filet (rechts) aus Versuch 2a.** Die Fische erhielten eine Diät mit FVO (Fischöl und pflanzliche Öle) und verschiedene Diäten mit AVO (*Buglossoides arvensis* Öl und pflanzliche Öle) und Equol zu 0, 0,1, 0,2 und 0,3% (C, EQ1, EQ2, EQ3) über einen Zeitraum von acht Wochen. Daten (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3, bestehend aus je fünf Lebern bzw. fünf Filets) mit Beschriftung unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ). Hochbuchstaben in Klammern () markieren eine Tendenz ( $p < 0,01$ ).

### 4.4 Ergebnisse aus Versuch 2b

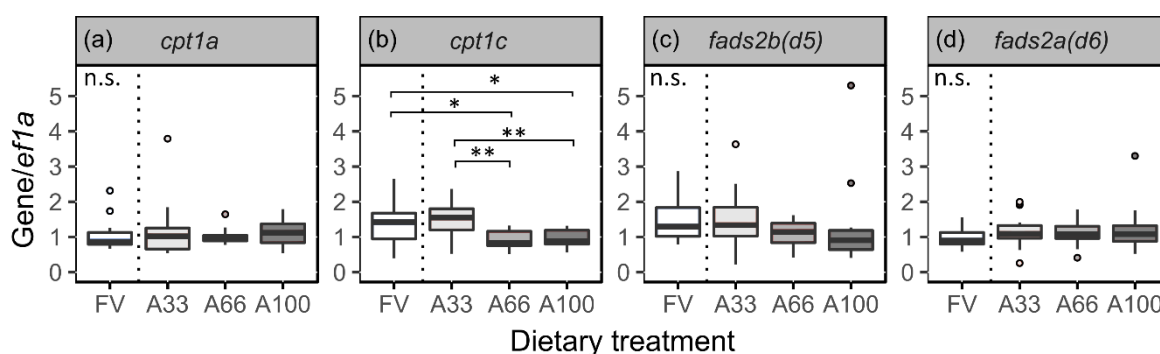
Alle Versuchsgruppen konnten ihr Initialgewicht über die acht Wochen hinweg mehr als verdoppeln. Fische, die mit der Diät Ahi100 gefüttert wurden, wiesen jedoch signifikant höhere Endgewichte auf als Fische, die mit der Fischöl-basierten Kontrolldiät C-FVO gefüttert wurden. In der Leber wurden signifikant höhere EPA- und DHA-Gehalte und im Filet signifikant höhere EPA-Gehalte in den Fischen gefunden, die die Diäten Ahi66 und Ahi100 erhielten, verglichen mit denen, die mit C-FVO gefüttert wurden. Der Gehalt an DHA im Filet unterschied sich nicht



signifikant zwischen den Fütterungsgruppen. Die mRNA steady state Level der delta-5 und delta-6 Desaturase sowie der Carnitinpalmitoyltransferase 1 (cpt1) a in den Lebern der Regenbogenforellen wurden durch die unterschiedlichen Diäten nicht verändert. Im Gegensatz dazu wurden der cpt1c-mRNA steady state Level in Fischen, die mit Ahi66 und Ahi100 gefüttert wurden signifikant herunterreguliert.



**Abbildung 8 EPA- und DHA-Gehalte im Futtermittel und im Filet der Regenbogenforellen aus Versuch 2b.** Die Fische wurden acht Wochen mit Futtermitteln basierend auf verschiedenen Ölkombinationen gefüttert. C-FVO enthielt eine Mischung aus Fischöl und pflanzlichen Ölen. Diese Mischung wurde zu 33, 66 und 100% durch *Buglossoides arvensis* Öl ersetzt (Ahi33, Ahi66, Ahi100). Daten (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3, bestehend aus je fünf Filets) mit Beschriftung unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 9 Hepatische mRNA steady state Level der Carnitinpalmitoyltransferase 1 (cpt1) a (a) und cpt1 c (b) sowie der delta-5 (c) und delta-6 Desaturase (d) aus Versuch 2b.** Regenbogenforellen wurden acht Wochen lang mit mit Futtermitteln basierend auf verschiedenen Ölkombinationen gefüttert. FV (entspr. C-FVO) enthielt eine Mischung aus Fischöl und pflanzlichen Ölen. Diese Mischung wurde zu 33, 66 und 100% durch *Buglossoides arvensis* Öl ersetzt (A33, A66, A100). Hepatische mRNA steady state Level (n=15) wurde mittels qRT-PCR Analyse bestimmt und auf das Houskeeping Gen ef1a normalisiert. Signifikante Unterschiede sind mit \* markiert;  $p < 0,05$  (\*)  $< 0,01$  (\*\*).

## 5. Diskussion der Ergebnisse

In Versuch 1 zeigten nur diejenigen Fische, die mit Equol und Genistein gefüttert wurden, erhöhte DHA-Werte im Ganzkörperhomogenat. Im Gegensatz dazu wurden die EPA- und DHA-Gehalte im Filet und in der Leber nicht durch die Futtermittel beeinflusst. Equol könnte die Biosynthese von DHA über östrogen-ähnliche Wirkmechanismen gesteigert haben. Ein Fakt, der diese These stützt, ist die Erhöhung der Fettsäure 18:0 (Stearinsäure) in der Leber dieser Fische. Ein Anstieg dieser Fettsäure wurde mit steigenden Östrogenspiegeln bei Ratten in Verbindung gebracht [51]. Im Gegensatz dazu könnte Genistein den DHA-Gehalt im Ganzkörperhomogenat aufgrund der anti-oxidativen Eigenschaften [41] oder mittels Bindung an Transkriptionsfaktoren, zum Beispiel PPAR $\alpha$  [52], erhöht haben. Zum besseren Verständnis der potentiellen Wirkmechanismen dieser Stoffe, wurden mögliche Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel der Leber untersucht. Von besonderem Interesse waren hierbei die hepatische mRNA-Level und der Proteingehalt der Delta-6-Desaturase, einem Schlüsselenzym der LC-PUFA-Biosynthese. Der Anstieg des DHA-Gehalts wurde jedoch nicht durch die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse gestützt, da die Fische, die mit der Equol-Diät gefüttert wurden sogar verringerte mRNA-Level aufwiesen. Außerdem konnte kein Einfluss der Substanzen auf die Proteinmenge dieses Enzyms nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund könnte hierbei sein, dass die Fische bei der finalen Probenahme genüchert waren. Radioaktiv markiertes Genistein wies eine sehr geringe Halbwertszeit in Forellen auf [53]. Dadurch könnten die Substanzen zum Zeitpunkt der Probenahme bereits ausgeschieden worden sein und konnten so die Expression der Gene, die an der LC-PUFA Biosynthese beteiligt sind, nicht mehr beeinflussen. Ein weiterer Aspekt, der wichtig für den potentiellen Einsatz als Futtermittelrohstoff ist, ist die Wirkung der Substanzen auf das Wachstum und die Nährstoffzusammensetzung der Fische. Diese beiden Faktoren wurden ebenfalls nicht durch die Diäten beeinflusst. Somit können diese Substanzen in Konzentrationen von 0,15% der Trockensubstanz in der Diät für Regenbogenforellen verwendet werden, ohne die Leistungsparameter zu beeinträchtigen. Versuch 1 hat gezeigt, dass Equol und Genistein die DHA-Gehalte im Ganzkörperhomogenat von Regenbogenforellen erhöhen können, jedoch nur in einem geringen Ausmaß.

In Versuch 2a sollte ein möglicher Dosis-Wirkungszusammenhang der Substanzen auf die LC-PUFA Biosynthese untersucht werden, um die Gehalte an (EPA und) DHA auch im Filet zu steigern. Bioaktive Substanzen im Futtermittel können durch höhere Konzentrationen auch einen negativen Effekt auf das Wachstum von Fischen ausüben. Dieser Effekt wurde in einigen Studien mit Regenbogenforellen und dem Atlantischen Lachs beobachtet [54–56]. In der aktuellen Studie wurden jedoch keine Auswirkungen einer höheren Konzentration des jeweiligen Stoffs auf das Wachstum der Fische gefunden. Dieser Befund ist allerdings auf das tägliche Fütterungsniveau von 1,6% der Biomasse der Fische beschränkt und schließt nicht aus, dass es bei einer höheren Futteraufnahme zu einer Beeinträchtigung des Fischwachstums kommen kann. Ähnlich zu den Ergebnissen aus Versuch 1 wiesen Regenbogenforellen, die mit Equol gefüttert wurden, in der Studie in Versuch 2a höhere Stearinsäuregehalte (C18:0) in der Leber auf. Zusätzlich waren bei diesen Fischen die Lebergewichte erhöht. Dies deutet auf eine östrogen-ähnliche Wirkung von Equol in der Leber hin und unterstreicht somit die Annahme aus Versuch 1. Die Fische, die mit Equol bzw. Genistein in Kombination mit pflanzlichen Ölen (VO-) gefüttert wurden, wiesen keine signifikanten Effekte auf die LC-PUFA-Gehalte in der Leber, im Filet und im Ganzkörperhomogenat auf. Es scheint aber, als erziele Equol in Zusammenhang mit

*Buglossoides arvensis* Öl (AVO-) vor allem in der Leber maßgebliche Effekte auf das Fettsäuremuster. So steigerte diese Kombination die LC-PUFA-Gehalte signifikant in diesem Gewebe. Die Anfangshypothese, dass Equol ebenfalls über östrogen-ähnliche Wirkmechanismen die Expression der Zielgene der Biosynthese steigern könnte, konnte dagegen nicht belegt werden. Auch in diesem Versuch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den mRNA-Leveln der Delta-6-Desaturase in den Lebern von Fischen der verschiedenen Futtergruppen. Demnach kann der DHA-Anstieg in der Leber der mit *Buglossoides arvensis* Öl und Equol gefütterten Fische nicht über eine erhöhte Genexpression der Delta-6-Desaturase erklärt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Equol die Aktivität dieser Desaturase oder eines Transkriptionsfaktors, der zentral an der Biosynthese beteiligt ist, erhöht. Dies wäre über eine Bindung an Östrogenrezeptoren möglich, die für Equol bereits beschrieben wurde [29]. Im Vergleich dazu wies das Filet der Fische, denen Diäten mit 0,2 und 0,3% Equol Supplementierung gefüttert wurden, allerdings geringere EPA-Gehalte und ähnliche DHA-Gehalte auf, wie diejenigen Fische, die die Fischöl-Kontrolldiät erhielten. Indessen ist die DHA-Synthese relativ langsam [8] und es könnte sein, dass zusätzliche Zeit erforderlich ist, um die DHA-Gehalte der Fische, die mit der Kontrolldiät auf Fischölbasis gefüttert wurden, zu überschreiten.

Dass Equol in Verbindung mit *Buglossoides arvensis* Öl einen Effekt auf die LC-PUFA-Synthese zeigt, dagegen aber nicht in Verbindung mit den pflanzlichen Ölen (VO-) in Versuch 2a, könnte am diätetischen SDA-Gehalt liegen, der vermutlich zu einer gesteigerten Effizienz der Biosynthese beigetragen haben könnte. Verglichen mit den Resultaten aus Versuch 1, in denen Equol DHA im Ganzkörperhomogenat erhöhen konnte, ist der diätetische Gehalte an EPA und DHA zu nennen. Dieser war in den VO-Diäten aus Versuch 1 höher als in den VO-Diäten aus Versuch 2a. Daher könnte es möglich sein, dass geringe LC-PUFA Gehalte im Futtermittel die endogene LC-PUFA-Biosynthesekapazität der Fische bereits voll ausschöpfen und eine weitere Stimulation mittels Isoflavonen nicht möglich ist. Auf Grund der nicht vorhandenen bis geringen Wirkung erscheint die Verwendung von Equol und Genistein in Diäten auf der Basis kommerziell eingesetzter Pflanzenöle zur Erhöhung der LC-PUFA-Gehalte im Filet von Regenbogenforellen nur in begrenztem Umfang möglich.

In Versuch 2b sollte untersucht werden, ob höhere ALA- und SDA-Gehalte im Futtermittel die Effizienz der endogenen EPA- und DHA-Biosynthese bei Regenbogenforellen steigern können. Dafür wurde ein Öl der Pflanze *Buglossoides arvensis* verwendet. Die höheren Gehalte an ALA und SDA in den Futtermitteln mit 66 und 100% *Buglossoides arvensis* Öl-Anteil führten zu einem signifikanten Anstieg des EPA-Gehalts im Forellenfilet im Vergleich zu den Fischen, die mit der Kontrolldiät gefüttert wurden. Dies ist besonders relevant, da die *Buglossoides arvensis* Öl-Diäten deutlich geringere EPA-Gehalte als die Kontrolldiät, die aus einer Mischung aus Fischöl und pflanzlichen Ölen bestand (FVO), aufwiesen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine größere Substratmenge an Vorläufer-Fettsäuren (ALA und SDA) tatsächlich die Effizienz der LC-PUFA Synthese steigern kann. Für die Biosynthese von EPA wird ein Delta-5-Desaturaseschritt benötigt. So wiesen Lachse, die mit hohen SDA-Gehalten im Futtermittel gefüttert wurden, eine gesteigerte mRNA-Expression der Delta-5-Desaturase auf [57]. Die mRNA-Level der Delta-5-Desaturase der Fische dieses Versuchs zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Futtergruppen. Da sich außerdem die DHA-Gehalte der Fischfilets nicht signifikant voneinander unterschieden, scheint es, als könnten hohe Gehalte an ALA und SDA die geringen EPA und DHA Gehalte in der Diät kompensieren. Darüber hinaus wiesen die Forellen, die mit den höchsten

Konzentrationen an *Buglossoides arvensis* Öl gefüttert wurden, die signifikant höchsten Körperendgewichte auf. Dieses Ergebnis unterstreicht das Potential des *Buglossoides arvensis* Öls als Alternative zum Einsatz von Fischöl in Futtermitteln für Regenbogenforellen.

## 6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

Ein Futtermittel muss eine optimale physikalische und chemische Qualität aufweisen, die an den Fisch angepasst ist, um eine hohe Produktqualität für die menschliche Ernährung zu erreichen. Außerdem muss es ökologisch und ökonomisch sinnvoll sein. In dieser Arbeit wurden drei Ansätze untersucht, um diätetisches Fischöl durch pflanzliche Öle zu ersetzen und die LC-PUFA-Spiegel in Regenbogenforellen zu erhöhen. Alle Strategien hatten keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der Regenbogenforellen. Ferner wurde die Nährstoffzusammensetzung von Ganzkörperhomogenaten nicht beeinflusst. In Anbetracht dieser Ergebnisse scheinen die Substanzen und Öle, die in den Versuchen dieser Arbeit verwendet wurden, für Regenbogenforellenfutter geeignet zu sein. Ihr Potenzial, die EPA- und DHA-Gehalte im Gewebe von Regenbogenforellen zu erhöhen, um eine hohe Produktqualität für die menschliche Ernährung zu erreichen, ist jedoch weniger eindeutig. Unter allen getesteten Substanzen zeigten nur Genistein und Equol einen Anstieg der DHA-Werte von 8% in Ganzkörperhomogenaten, nicht jedoch in den Filets (Versuch 1), und beeinflussten die DHA-Gehalte im Gewebe nicht, wenn die LC-PUFA-Gehalte in der Nahrung niedriger waren (Versuch 2a in VO-Diäten). Darüber hinaus führte die Kombination von *Buglossoides arvensis* Öl und Equol dazu, dass die DHA-Filetgehalte im Vergleich zur *Buglossoides arvensis* Öl-Kontrollgruppe um 7% erhöht wurden und ähnlich zu den Fischen waren, die mit Fischöl gefüttert wurden (Versuch 2a). Andere Studien berichten jedoch, dass bioaktive Substanzen wie Resveratrol die DHA-Werte um 43-71% [55,58] und Sesamin in Geweben von Regenbogenforellen um bis zu 37% erhöhten [59]. In Anbetracht der Tatsache, dass Isoflavone relativ teuer sind (Equol: 1,90 US\$/g), erscheint die Verwendung dieser Substanzen zur Erhöhung des LC-PUFA-Spiegels in Fischfilets an diesem Punkt wirtschaftlich fragwürdig.

Die Verwendung von *Buglossoides arvensis* Öl in Regenbogenforellen-Diäten scheint dagegen vielversprechend zu sein. Durch den Einsatz dieses Öls konnten sogar die EPA-Filet-Gehalte von Fischen überschritten werden, die mit einer auf Fischöl basierenden Kontrolldiät gefüttert wurden. Außerdem waren die Gehalte an omega-3 (n-3) Fettsäuren in den Filets dieser Fische signifikant erhöht. Die Zunahme von ALA und SDA und die gleichzeitige Abnahme von Linolsäure und Arachidonsäure erhöhten das Verhältnis von n-3 zu n-6 im Filet von Regenbogenforellen, die mit dieser Diät gefüttert wurden. Dies könnte auch für die menschliche Ernährung relevant sein. Der Konsum von n-3-PUFA-reichen Lebensmitteln kann das Risiko für bestimmte chronische Krankheiten senken und sich positiv auf bestimmte Krebsarten beim Menschen ausüben [60–63]. Derzeit sind die Verfügbarkeit und die Kosten von *Buglossoides arvensis* Öl (36 US\$/kg) für die Aquakultur nicht rentabel und deshalb in der Aquakultur kurzfristig nicht praxisrelevant. Daher wären eine erhöhte Produktion und ein höherer Ertrag der Pflanze erforderlich, um den Preis zu senken. Darüber hinaus könnte eine längere Versuchsperiode die LC-PUFA-Gehalte in den Filets der Forellen, die mit *Buglossoides arvensis* Öl gefüttert wurden, möglicherweise weiter erhöhen. Hier wäre also sicherlich langfristig Potential zum Einsatz in der Aquakultur vorhanden.

## 7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Innerhalb dieses Projekts konnte gezeigt werden, dass die endogene LC-PUFA-Biosynthese in Regenbogenforellen durch Isoflavone hochreguliert werden kann. Durch den Einsatz des *Buglossoides arvensis* Öls konnte außerdem nachgewiesen werden, dass eine Hochregulierung der LC-PUFA-Biosynthese in diesen Fischen auch über eine spezielle Zusammensetzung von Nahrungsfettsäuren und durch die Kombination von Isoflavonen und SDA-reichen Ölen möglich ist. Durch diese drei Ansätze konnte eine Steigerung der Produktqualität der Forellen erreicht werden. Im Gegensatz dazu konnte dieser Effekt aber nicht auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen werden, da es zu keiner signifikanten Steigerung der Expression der delta-5- bzw. delta-6-Desaturase kam. Leider ist der Ansatz, die LC-PUFA-Gehalte im Filet durch den Einsatz von Isoflavonen zu steigern, nur begrenzt möglich. Außerdem scheint die Wirksamkeit der Isoflavone abhängig von der Fettsäurezusammensetzung des Futtermittels zu sein. Die genauen Wirkmechanismen der Isoflavone, die durchaus auch denen des Östrogens ähneln könnten, sind weiterhin nicht bekannt.

Bezogen auf den Einsatz des *Buglossoides arvensis* Öls besteht die Möglichkeit, dass durch eine Verlängerung des Versuchszeitraums, neben EPA, auch der Gehalt an DHA im Filet gesteigert werden könnte. Zusätzlich könnte der Öl-Ertrag der Pflanze *Buglossoides arvensis* durch züchterische Maßnahmen gesteigert und so gleichzeitig der Preis des Öls als Rohstoff für Futtermittel in der Aquakultur gesenkt werden.

## 8. Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt dieses Projekt, dass die endogene Biosynthese von LC-PUFA in Regenbogenforellen durch Fettsäuren in der Nahrung und den Isoflavon-Metaboliten Equol reguliert werden kann. Der Ansatz, die LC-PUFA-Gehalte im Filet durch Stimulierung der endogenen Biosynthese zu steigern, um die Produktqualität für den menschlichen Verzehr zu erhöhen, ist jedoch nur in begrenztem Umfang möglich. Ferner scheint es, dass die Wirksamkeit von Equol und Genistein von der Fettsäurezusammensetzung des Futtermittels abhängt. Diese Substanzen haben keine Wirkung auf die LC-PUFA-Gehalte in der Forelle, wenn im Futtermittel die EPA- und DHA-Konzentrationen gering sind und gleichzeitig nur ALA, aber kein SDA, im Futtermittel vorhanden ist. Zukünftige Studien sollten den Einsatz von Ahiflower Öl und Equol zur Steigerung der LC-PUFA-Biosynthese über einen längeren Versuchszeitraum, idealerweise über einen gesamten Produktionszyklus, untersuchen, um das gesamte Potential dieser Rohstoffe zu bewerten.

## 9. Literaturverzeichnis

1. Makrides, M.; Neumann, A.; Byard, W.; Gibson, A. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast-and formula-fed infants. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, 189–194, doi:10.1093/ajcn/60.2.189.
2. Abedi, E.; Sahari, M. A. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Sci. Nutr.* **2014**, *2*, 443–463, doi:10.1002/fsn3.121.
3. Burdge, G. C.; Calder, P. C. Conversion of  $\alpha$ -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod. Nutr. Dev.* **2005**, *45*, 581–597, doi:10.1051/rnd.
4. Calder, P. C. Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future. *Proc. Nutr. Soc.* **2018**, *77*, 52–72, doi:10.1017/S0029665117003950.
5. Rosenlund, G.; Corraze, G.; Izquierdo, M.; Torstensen, B. E. Fish Oil Replacement and Final Product Quality. In *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*; Turchini, G. M., Ng, W. K., Tocher, D. R., Eds.; CRC Press. Taylor & Francis group: Boca Raton, FL, 2010; pp. 487–522 ISBN 978-1-4398-0862-7.
6. Vagner, M.; Santigosa, E. Characterization and modulation of gene expression and enzymatic activity of delta-6 desaturase in teleosts: A review. *Aquaculture* **2011**, *315*, 131–143, doi:10.1016/j.aquaculture.2010.11.031.
7. Schulz, C.; Huber, M.; Ogunji, J.; Rennert, B. Effects of varying dietary protein to lipid ratios on growth performance and body composition of juvenile pike perch (*Sander lucioperca*). *Aquac. Nutr.* **2008**, *14*, 166–173, doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00516.x.
8. Bell, M. V.; Dick, J. R.; Porter, A. E. A. Biosynthesis and tissue deposition of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids* **2001**, *36*, 1153–1159, doi:10.1007/s11745-001-0826-1.
9. Caballero, M. J.; Obach, A.; Rosenlund, G.; Montero, D.; Gisvold, M.; Izquierdo, M. S. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **2002**, *214*, 253–271, doi:10.1016/S0044-8486(01)00852-3.
10. Drew, M. D.; Ogunkoya, A. E.; Janz, D. M.; Van Kessel, A. G. Dietary influence of replacing fish meal and oil with canola protein concentrate and vegetable oils on growth performance, fatty acid composition and organochlorine residues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **2007**, *267*, 260–268, doi:10.1016/j.aquaculture.2007.01.002.
11. Turchini, G. M.; Francis, D. S. Fatty acid metabolism (desaturation, elongation and  $\beta$ -oxidation) in rainbow trout fed fish oil- or linseed oil-based diets. *Br. J. Nutr.* **2009**, *102*, 69–81, doi:10.1017/S0007114508137874.
12. Tacon, A. G. J.; Metian, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* **2008**, *285*, 146–158, doi:10.1016/j.aquaculture.2008.08.015.
13. Turchini, G. M.; Torstensen, B. E.; Ng, W. K. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquac.* **2009**, *1*, 10–57, doi:10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x.
14. Ytrestøyl, T.; Aas, T. S.; Åsgård, T. Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture* **2015**, *448*, 365–374, doi:10.1016/j.aquaculture.2015.06.023.
15. NRC *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*; Council, N. R., Ed.; The National Academies Press: Washington, DC, USA, 2011; ISBN 9780309163385.
16. Miller, M. R.; Nichols, P. D.; Carter, C. G. n-3 Oil sources for use in aquaculture - alternatives to the unsustainable harvest of wild fish. *Nutr. Res. Rev.* **2008**, *21*, 85–96, doi:10.1017/S0954422408102414.
17. Naylor, R. L.; Hardy, R. W.; Bureau, D. P.; Chiu, A.; Elliott, M.; Farrell, A. P.; Forster, I.; Gatlin, D. M.; Goldburgh, R. J.; Hua, K.; Nichols, P. D. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 15103–15110, doi:10.1073/pnas.0905235106.
18. Tocher, D. R.; Francis, D. S.; Coupland, K. n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Rich Vegetable Oils and Blends. In *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*; Turchini, G. M., Ng, W. K., Tocher, D. R., Eds.; Taylor & Francis Group, CRC Press: Boca Ranton, FL, 2010; pp. 209–244 ISBN 978-1-4398-0862-7.

19. Sprague, M.; Dick, J. R.; Tocher, D. R. Impact of sustainable feeds on omega-3 long-chain fatty acid levels in farmed Atlantic salmon, 2006-2015. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–9, doi:10.1038/srep21892.
20. Kitson, A. P.; Stroud, C. K.; Stark, K. D. Elevated production of docosahexaenoic acid in females: Potential molecular mechanisms. *Lipids* **2010**, *45*, 209–224, doi:10.1007/s11745-010-3391-6.
21. Wang, Y.; Botolin, D.; Christian, B.; Busik, J.; Xu, J.; Donald, B. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 706–715.
22. Jump, D. B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* **2002**, *13*, 155–164, doi:10.1097/00041433-200204000-00007.
23. Nakamura, M. T.; Cheon, Y.; Li, Y.; Nara, T. Y. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids* **2004**, *39*, 1077–1083, doi:10.1007/s11745-004-1333-0.
24. Rochfort, S.; Panozzo, J. Phytochemicals for health, the role of pulses. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7981–7994, doi:10.1021/jf071704w.
25. Klejdus, B.; Vitamvásová-Štěrbová, D.; Kubáň, V. Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *450*, 81–97, doi:10.1016/S0003-2670(01)01370-8.
26. Setchell, K. D. R.; Brown, N. M.; Lydeking-Olsen, E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3577–3584, doi:10.1093/jn/132.12.3577.
27. Setchell, K. D. R.; Borriello, S. P.; Hulme, P. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: Possible roles in hormone-dependent disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **1984**, *40*, 569–578, doi:10.1093/ajcn/40.3.569.
28. Setchell, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 1333S–1346S, doi:10.1093/ajcn/68.6.1333S.
29. Setchell, K. D.; Clerici, C.; Lephart, E. D.; Cole, S. J.; Heenan, C.; Castellani, D.; Wolfe, B. E.; Nechemias-zimmer, L.; Brown, N. M.; Lund, T. D.; Handa, R. J.; Heubi, J. E. S-Equol, a potent ligand for estrogen receptor  $\beta$ , is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 1072–1079, doi:10.1093/ajcn/81.5.1072.
30. Rupasinghe, H. P. V.; Sekhon-loodu, S.; Mantso, T.; Panayiotidis, M. I. Pharmacology & Therapeutics Phytochemicals in regulating fatty acid  $\beta$ -oxidation: Potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *165*, 153–163, doi:10.1016/j.pharmthera.2016.06.005.
31. Latonnel, K.; Fostier, A.; Le Menn, F.; Bennetau-Pelissero, C. Binding affinities of hepatic nuclear estrogen receptors for phytoestrogens in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **2002**, *129*, 69–79, doi:10.1016/S0016-6480(02)00512-9.
32. Kuiper, G. G. J. M.; Lemmen, J. G.; Carlsson, B.; Corton, J. C.; Safe, S. H.; Saag, P. T. van der; Burg, B. van der; Gustafsson, J.-Å. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor  $\beta$ . *Endocrinology* **1998**, *139*, 4252–4263, doi:10.1210/en.139.10.4252.
33. Kitson, A. P.; Marks, K. A.; Shaw, B.; Mutch, D. M.; Stark, K. D. Treatment of ovariectomized rats with 17 $\beta$ -estradiol increases hepatic delta-6 desaturase enzyme expression and docosahexaenoic acid levels in hepatic and plasma phospholipids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2013**, *89*, 81–88, doi:10.1016/j.plefa.2013.05.003.
34. González-Bengtsson, A.; Asadi, A.; Gao, H.; Dahlman-Wright, K.; Jacobsson, A. Estrogen enhances the expression of the polyunsaturated fatty acid elongase Elovl2 via ER $\alpha$  in breast cancer cells. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–18, doi:10.1371/journal.pone.0164241.
35. Childs, C. E.; Hoile, S. P.; Burdge, G. C.; Calder, P. C. Changes in rat n-3 and n-6 fatty acid composition during pregnancy are associated with progesterone concentrations and hepatic FADS2 expression. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2012**, *86*, 141–147, doi:10.1016/j.plefa.2012.03.007.

36. Sargent, J. R.; Tocher, D. R.; Bell, J. G. The Lipids. In *Fish Nutrition*; Halver, J. E., Ed.; Academic Press: San Diego, 2002; pp. 181–257 ISBN 123196523.
37. Mezei, O.; Banz, W. J.; Steger, R. W.; Peluso, M. R.; Winters, T. a; Shay, N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1238–43, doi:10.1093/jn/133.5.1238.
38. Yoon, M. The role of PPAR $\alpha$  in lipid metabolism and obesity: Focusing on the effects of estrogen on PPAR $\alpha$  actions. *Pharmacol. Res.* **2009**, *60*, 151–159, doi:10.1016/j.phrs.2009.02.004.
39. Dang, Z. C.; Audinot, V.; Papapoulos, S. E.; Boutin, J. A.; Löwik, C. W. G. M. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 962–967, doi:10.1074/jbc.M209483200.
40. Yousefi Jourdehi, A.; Sudagar, M.; Bahmani, M.; Hosseini, S. A.; Dehghani, A. A.; Yazdani, M. A. Comparative study of dietary soy phytoestrogens genistein and equol effects on growth parameters and ovarian development in farmed female beluga sturgeon, *Huso huso*. *Fish Physiol. Biochem.* **2014**, *40*, 117–128, doi:10.1007/s10695-013-9829-z.
41. Hernandez-Montes, E.; Pollard, S. E.; Vauzour, D.; Jofre-Montseny, L.; Rota, C.; Rimbach, G.; Weinberg, P. D.; Spencer, J. P. E. Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *346*, 851–859, doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.197.
42. Tocher, D. R. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* **2015**, *449*, 94–107, doi:10.1016/j.aquaculture.2015.01.010.
43. Nakamura, M. T.; Nara, T. Y. Structure, Function, and Dietary Regulation of  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$ , and  $\Delta 9$  Desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* **2004**, *24*, 345–376, doi:10.1146/annurev.nutr.24.121803.063211.
44. Johansson, A.; Laakso, P.; Kallio, H. Characterization of seed oils of wild, edible Finnish berries. *Zeitschrift für Leb. und -forsch. A* **1997**, *204*, 300–307, doi:10.1007/s002170050081.
45. Brenner, R. R. Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **1981**, 41–47, doi:10.1016/0163-7827(81)90012-6.
46. James, M. J.; Ursin, V. M.; Cleland, L. G. Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n-3 fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 1140–1145, doi:10.1093/ajcn/77.5.1140.
47. Kuhnt, K.; Weiß, S.; Kiehntopf, M.; Jahreis, G. Consumption of echium oil increases EPA and DPA in blood fractions more efficiently compared to linseed oil in humans. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 32, doi:10.1186/s12944-016-0199-2.
48. Harris, W. S.; DiRienzo, M. A.; Sands, S. A.; George, C.; Jones, P. G.; Eapen, A. K. Stearidonic acid increases the red blood cell and heart eicosapentaenoic acid content in dogs. *Lipids* **2007**, *42*, 325–333, doi:10.1007/s11745-007-3036-6.
49. Ishihara, K.; Komatsu, W.; Saito, H.; Shinohara, K. Comparison of the Effects of Dietary  $\alpha$ -Linolenic, Stearidonic, and Eicosapentaenoic Acids on Production of Inflammatory Mediators in Mice. *Lipids* **2002**, *37*, 481–6, doi:10.1007/s11745-002-0921-3.
50. Surette, M. E. Dietary omega-3 PUFA and health: Stearidonic acid-containing seed oils as effective and sustainable alternatives to traditional marine oils. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 748–759, doi:10.1002/mnfr.201200706.
51. Marks, K. A.; Kitson, A. P.; Shaw, B.; Mutch, D. M.; Stark, K. D. Stearoyl-CoA desaturase 1, elongase 6 and their fatty acid products and precursors are altered in ovariectomized rats with 17 $\beta$ -estradiol and progesterone treatment. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2013**, *89*, 89–96, doi:10.1016/j.plefa.2013.05.002.
52. Kim, S.; Shin, H.-J.; Kim, S. Y.; Kim, J. H.; Lee, Y. S.; Kim, D.-H.; Lee, M.-O. Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPAR $\alpha$ . *Mol. Cell. Endocrinol.* **2004**, *220*, 51–8, doi:10.1016/j.mce.2004.03.011.
53. Gontier-Latonnelle, K.; Cravedi, J. P.; Laurentie, M.; Perdu, E.; Lamothe, V.; Le Menn, F.; Bennetau-Pelissero, C. Disposition of genistein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **2007**, *150*, 298–308, doi:10.1016/j.ygcen.2006.10.001.
54. Menoyo, D.; Kühn, G.; Ruiz-Lopez, N.; Pallauf, K.; Stubhaug, I.; Pastor, J. J.;



- Ipharraguerre, I. R.; Rimbach, G. Dietary resveratrol impairs body weight gain due to reduction of feed intake without affecting fatty acid composition in Atlantic salmon. *animal* **2018**, 1–8, doi:10.1017/S1751731118000812.
55. Torno, C.; Staats, S.; De Pascual-Teresa, S.; Rimbach, G.; Schulz, C. Fatty acid profile is modulated by dietary resveratrol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Drugs* **2017**, 15, 1–19, doi:10.3390/md15080252.
  56. Schiller Vestergren, A.; Wagner, L.; Pickova, J.; Rosenlund, G.; Kamal-Eldin, A.; Trattner, S. Sesamin modulates gene expression without corresponding effects on fatty acids in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Lipids* **2012**, 47, 897–911, doi:10.1007/s11745-012-3697-7.
  57. Miller, M. R.; Bridle, A. R.; Nichols, P. D.; Carter, C. G. Increased Elongase and Desaturase Gene Expression with Stearidonic Acid Enriched Diet Does Not Enhance Long-Chain (n-3) Content of Seawater Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *J. Nutr.* **2008**, 138, 2179–2185, doi:10.3945/jn.108.091702.
  58. Torno, C.; Staats, S.; De Pascual-Teresa, S.; Rimbach, G.; Schulz, C. Effects of resveratrol and genistein on growth, nutrient utilization, and fatty acid composition in rainbow trout. *Animal* **2018**, doi:10.1017/S1751731118002458.
  59. Trattner, S.; Kamal-Eldin, a.; Brännäs, E.; Moazzami, a.; Zlabek, V.; Larsson, P.; Ruyter, B.; Gjøslen, T.; Pickova, J. Sesamin supplementation increases white muscle docosahexaenoic acid (DHA) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high alpha-linolenic acid (ALA) containing vegetable oil: Metabolic actions. *Lipids* **2008**, 43, 989–997, doi:10.1007/s11745-008-3228-8.
  60. Rallidis, L. S.; Paschos, G.; Liakos, G. K.; Velissaridou, A. H.; Anastasiadis, G.; Zampelas, A. Dietary  $\alpha$ -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis* **2003**, 167, 237–242, doi:10.1016/S0021-9150(02)00427-6.
  61. Singh, R. B.; Niaz, M. A.; Sharma, J. P.; Kumar, R.; Rastogi, V.; Moshiri, M. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival--4. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **1997**, 11, 485–91, doi:10.1023/A:1007757724505.
  62. Klein, V.; Chajes, V.; Germain, E.; Schulgen, G.; Pinault, M.; Malvy, D.; Lefrancq, T.; Fignon, A.; Le Floch, O.; Lhuillery, C.; Bougnoux, P. Low alpha-linolenic acid content of adipose breast tissue is associated with an increased risk of breast cancer. *Eur J Cancer* **2000**, 36, 335–340, doi:10.1016/S0959-8049(99)00254-3.
  63. Stéfani, E. De; Deneo-Pellegrini, H.; Boffetta, P.; Ronco, A.; Mendilaharsu, M.  $\alpha$ -Linolenic Acid and Risk of Prostate Cancer: A Case-Control Study in Uruguay. *Cancer Epidemiology, Biomarkers Prev.* **2000**, 9, 335–338.

## 10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

### 10.1 Dissertation

Fickler Anna: New approaches to enhance the endogenous LC-PUFA biosynthesis in rainbow trout, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

### 10.2 Veröffentlichungen:

Fickler A, Staats S, Hasler M, Rimbach G, Schulz C. Dietary *Buglossoides arvensis* oil as a potential candidate to substitute fish oil in rainbow trout diets. *Lipids*; 2018;53: 8 (809-823). doi: 10.1002/lipd.12092

Fickler A, Staats S, Rimbach G, Schulz C. Screening dietary biochanin A, daidzein, equol and genistein for their potential to increase DHA biosynthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLOS ONE*, 2019; 14: 1. doi: 10.1371/journal.pone.0210197

Fickler A, Staats S, Michl S C, Hasler M, Rimbach G, Schulz C. Combination of dietary Ahiflower oil and equol enhances LC-PUFA levels in rainbow trout tissues. *Lipids*, 2019. doi: 10.1002/lipd.12117

Fickler A, Torno C, Staats S, Rimbach G, Schulz C. Are dietary genistein and equol potent enhancers of EPA and DHA levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)? (submitted)

### 10.3 Vorträge

- 8. Büsumer Fischtag in Büsum, Juni 2017

Anna Fickler: „Einfluss der Futtermittelzusammensetzung auf die Biosynthese von EPA und DHA in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)“

- 9. Büsumer Fischtag in Büsum, Juni 2018

Anna Fickler, Claudia Torno: „Neue Wege zur Sicherstellung einer hohen Produktqualität in der Fischernährung“

- Aquaculture Europe in Dubrovnik, Oktober 2017

Anna Fickler, Stefanie Staats, Gerald Rimbach, Carsten Schulz: „Effect Of Dietary Isoflavone Supplementation And Varying n-3 Fatty Acid Supply On Growth Performance And Fatty Acid Biosynthesis In Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)“

- AQUA 2018 in Montpellier, August 2018

Anna Fickler, Stefanie Staats, Gerald Rimbach, Carsten Schulz: „How to increase DHA levels in rainbow trout“

- Hochschultagung Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Februar 2018

Carsten Schulz, Anna Fickler, Claudia Torno: „Bioaktive Substanzen zur Sicherstellung einer hohen Fettqualität in Fischen“

## 10.4 Studienarbeiten

### Bachelorarbeiten:

Bahne Christiansen, Hochschule Bremerhaven: „Einfluss von Equol auf die Wachstumsleistung und Fettsäurezusammensetzung in der Ernährung von Regenbogenforellen“, April 2017.

Carsten Rohwedder, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel: „Einfluss einer pflanzlichen Fütterung mit Ahifloweröl auf das Wachstum und die Fettsäuresynthese von Regenbogenforellen“, September 2017.

Adrian Schweiger, Universität Hohenheim: „Effects of isoflavone supplementation on growth and body composition of rainbow trout“, Oktober 2017.

### Masterarbeit:

Huong Lien Turong, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel: „Effect of genistein and resveratrol on endogenous long chain PUFA synthesis - a study in cultured hepatocytes and rainbow trouts“, September 2016.

Fabrice Kuenen, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel: „Einfluss von Isoflavonen auf die Omega-3-Fettsäuresynthese - Studien in humanen HepG2- und D-11-Regenbogenforellen-Hepatozyten“, April 2017.

Julian Wessel, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel: „Einfluss von Genistein auf die Wachstumsleistung und Fettsäurezusammensetzung in der Ernährung von Regenbogenforellen“, April 2017.